

明細書

発芽バキュロウィルスを用いた蛋白質の発現と精製法

発明の属する技術分野

本発明は、バキュロウィルスの発現系を利用した小胞体膜又はゴルジ体膜等の膜に存在する蛋白質を発現させる技術に関する。より詳細には、本発明は、膜蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも1種の組換えバキュロウィルスを感染させた宿主を培養することにより該蛋白質を発芽バキュロウィルス中に発現させる方法に関する。

発明の背景

バキュロウィルス発現系はバキュロウィルスの多角体蛋白質 (polyhedrin) 遺伝子のプロモーターを利用して、目的遺伝子を Sf9 細胞で組換えを起こさせて、大量に発現させる系である。多角体蛋白質は、ウィルスが細胞内で越冬する際に使われるタイプの形である occlusion body として sf9 細胞の核に大量に発現される。多角体遺伝子に組換え蛋白質を導入し、発現した蛋白質を精製する系バキュロの発現系は、大腸菌の発現系に比べ、発現蛋白質が凝集を作りにくく、糖鎖の付加や金属イオンの配位など蛋白質の機能に必要な翻訳後修飾が入るなど利点が多い。

バキュロウィルスにはもう一つの生活環があり、ウィルスが増殖して感染するために、発芽型ウィルス (Budded virus : 本明細書中では発芽バキュロウィルスとも言う) となって Sf9 細胞膜を被って細胞外に放出される。この際に上記の多角体蛋白質に組換えた7回膜貫通型受容体が細胞膜に発現され、発芽したバキュロウィルスのエンベロープ上に回収されることが Bouvier らによって報告されている (Loisel TP, Ansanay H, St-Onge S, Gay B, Boulanger P, Strosberg AD, Marullo S, Bouvier M., Nat Biotechnol. 1997 Nov;15(12):1300-4., Recovery of homogeneous and functional beta 2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles : 並びに国際公開WO 98 / 4 6 7 7 7)。宿主細胞に発現された7回膜貫通型受容体は糖鎖構造など機能的でないものが多いのに比べ、

ウイルスエンベロープ上に回収される受容体は機能的な蛋白質のみであることが報告されている。しかし、Bouvier らは受容体蛋白質以外の膜蛋白質については言及していない。

発明の要旨

本発明は、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質をバキュロウイルス発現系を用いて活性を有する形態で効率よく発現させる方法を提供することを解決すべき課題とする。本発明はまた、上記方法を利用して上記発現蛋白質に対する抗体を産生する方法、上記方法を利用して医薬品等として有用な化学物質をスクリーニングする方法を提供することを解決すべき課題とした。

SREBP(sterol regulatoru element binding protein)2、HMG-CoA (ヒドロキシメチルグルタリルコエンザイム A) 還元酵素、SCAP (SREBP cleavage activating protein)、S1P (site 1 protease) は小胞体 (ER) 膜あるいはゴルジ体膜に分布する細胞内コレステロールフィードバック調節に関与する膜蛋白質群である。本発明者らは、これらの蛋白質をバキュロ発現系をもちいて Sf 9 細胞に発現させ、細胞外発芽ウイルスエンベロープに回収することに成功した。また、Sf 9 細胞膜により回収される膜蛋白質が分解産物が多いのに比べ、ウイルスエンベロープに回収される ER 膜蛋白質は単一バンドで回収され、安定性が高いことが判明した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも 1 種の組換えバキュロウイルスを感染させた宿主を培養することにより該蛋白質を発現させる方法において、該宿主から放出される発芽バキュロウイルス中に該蛋白質を発現させる方法が提供される。

本発明の別の側面によれば、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質をコードする遺伝子を含む組換えバキュロウイルスを感染させた宿主を培養し、該宿主から放出される発芽バキュロウイルスを回収し、該発芽バキュロウイルスから発現蛋白質を回収することを含む、蛋白質の調製方法が提供される。

好ましくは、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質は、細胞内小器官の膜結合蛋白質である。

好ましくは、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質は、SREBP 2、HMG-CoA 還元酵素、S1P、又は SREBP cleavage activating protein である。

好ましくは、宿主は昆虫細胞又は昆虫幼虫である。

本発明のさらに別の側面によれば、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも 1 種の組換えバキュロウイルスを感染させた宿主が放出する、発芽バキュロウイルスが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の発芽バキュロウイルスを用いて、上記蛋白質とその他の化学物質との相互作用を測定することを含む、化学物質のスクリーニング方法が提供される。

本発明のスクリーニング方法では、好ましくは、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構

造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質に対する阻害薬または活性化薬物がスクリーニングされる。

本発明のさらに別の側面によれば、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される2種類以上の蛋白質をコードする遺伝子をそれぞれ含む異なる2種類以上の組換えバキュロウイルスを共感染させることにより、上記2種類以上の蛋白質の機能を同時に発現させ、該機能を活性化又は抑制する化学物質をスクリーニングする方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の発芽バキュロウイルスを免疫原として用いることを特徴とする、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質に対する抗体を作製する方法、並びにこの方法により作製される抗体が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、SREBP2のSf9細胞への発現を示す図である。

図2は、培養上清に発現したSREBP2の遠心分離の結果を示す図である。

図3は、40,000gペレットの密度勾配遠心の結果を示す図である。

図4は、SREBPの発芽ウイルスからの可溶化と精製の結果を示す図である。

図5は、SREBPのマウス抗血清の作製の結果を示す図である。

図6は、S1Pの発芽ウイルスへの発現の結果を示す図である。

図7は、発芽ウイルス上のS1Pによる発芽ウイルス上のSREBPの切断を示す図である。

図8は、SCAPの発芽ウイルスへの発現の結果を示す図である。

図9は、SREBP2とSCAPの発芽ウイルスへの共発現の結果を示す図である。

発明の詳細な説明

以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。

本発明の方法は、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも1種の組換えバキュロウイルスを感染させた宿主を培養することにより該蛋白質を発現させる方法であって、該宿主から放出される発芽バキュロウイルス中に該蛋白質を発現させる方法である。

本明細書で言う「膜結合型」とは、蛋白質が細胞膜並びに細胞内小器官（例えば、小胞体やゴルジ体等）の形質膜に存在することを広く意味し、その蛋白質の種類は特に限定されない。好ましくは、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子又は膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質は、細胞内小器官の膜結合蛋白質であり、例えば、小胞体やゴルジ体の膜に結合した蛋白質である。

膜結合型酵素としては、コレステロール代謝に関わる HMG-CoA 還元酵素や ACAT(acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase)、 7α -hydroxylase などがあげられる。また解毒に関わるシトクローム P450系、ミトコンドリアに存在する ATP 合成酵素やシトクローム酸化酵素および還元酵素、NADH-Q 還元酵素などの電子伝達系酵素があげられる。またホルモンや調節因子、栄養因子などのプロセッシングに関わるプロセッシングプロテアーゼ群として S1P (site 1 protease)、furin、PC (proprotein convertase)、S2P(site 2 protease)、エンドセリン変換酵素 (endothelin converting enzyme)、アンギオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme)、neprilysin など、また notch シグナルなどのシグナル伝達系に関わる ADAMS(a disintegrin and metalloprotease) family や、アミロイド前駆体蛋白質を切断する β -セレクターゼや γ -セレクターゼ(例えば、プレセニリン(presenillin)など) や、細胞外基質の分解に関わる matrix metalloprotease 群があげられる。その他 diacylglycerol 合成酵素、ホスファチジン酸ホスファターゼ、ホスファチジルセリン合成酵素などの膜脂質代謝酵素、

adenylate cyclase などのシグナル伝達に關与する酵素があげられる。

膜結合型の酵素基質蛋白質としては、シグナル伝達、転写調節に關わる蛋白質としてステロール調節蛋白質 (SREBP)、Notch、Irel、ATF6 などがあげられ、またその他アミロイド前駆体蛋白質 (Amyloid precursor protein)、TNF α (tumor necrosis factor) precursor、Stem cell factor、M-CSF (monocyte colony stimulating factor) precursor、Klotho などがあげられる。

膜結合型酵素活性化因子としては、プレセニリン(presenillin)、SCAP(SREBP cleavage activating protein)、などがあげられる。

膜結合型輸送蛋白質としては、コレステロールなどの脂質を輸送する NPC (Niemann-Pick type c) 1、ABC(ATP-binding cassette)トランスポーター、カベオリン (caveolin)、脂肪酸トランスポーター(fatty acid transporter)があげられ、また GLUT1-4 などのグルコーストランスポーターを含む糖トランスポーター、glutamate transporter、serotonin transporter などのアミノ酸トランスポーターなどがあげられる。また細胞内ベジクル間の物質輸送に關与する膜蛋白質として Sec12 などがあげられる。

さらに膜を透過しない分子をある条件のもとに選択的に通過させるチャネル蛋白質があげられる。その中には水の選択的チャネルであるアクアポリンファミリー、またカリウムイオン、カルシウムイオン、ナトリウムイオンなどに対する選択的チャネルであるイオンチャネルなどがあげられる。

その他膜の構造蛋白質および接着に關与する蛋白質として、NCAM(Neural cell adhesion molecule)、ICAM(intercellular adhesion molecule)、カドヘリンファミリー、インテグリン、デスモコリン、デスモグレイン、L-selectin、connexin、グリコプロテインなどがあげられる。また免疫細胞において抗原提示に關わる主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC)、蛋白質の高次構造形成に關わると考えられる calnexin、PDI(protein disulfide isomerase)、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)、major prion protein precursor(プリオン)などのシャペロン蛋白質があげられる。

本発明では、上記したような発現させるための蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも 1 種の組換えバキュロウィルスを使用する。

昆虫に感染して病気を起こすウイルスであるバキュロウイルスは、環状の二本鎖DNAを遺伝子としてもつエンベロープウイルスで、鱗翅目、膜翅目および双翅目などの昆虫に感受性を示す。バキュロウイルスの中で、感染細胞の核内に多角体（ポリヒドラ）と呼ばれる封入体を大量につくる一群のウイルスが核多角体病ウイルス（NPV）である。多角体は、分子量31kDaのポリヘドリンタンパクより構成され、感染後期に大量につくられその中に多数のウイルス粒子を埋め込んでいる。多角体はウイルスが自然界で生存するためには必須であるが、ウイルスの増殖そのものには必要ないので、多角体遺伝子の代わりに発現させたい外来遺伝子を挿入してもウイルスは全く支障なく感染し増殖する。

本発明で用いられるバキュロウイルスとしては、NPVのキンウワバ亜科のオートグラフ・カリフォルニカ（*Autographa californica*）NPV（AcNPV）やカイコのボンビックス・モリ（*Bombyx mori*）NPV（BmNPV）などのウイルスがベクターとして用いることができる。

AcNPVの宿主（感染、継代細胞）としてはスポドプテラ・フルギベルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞（Sf細胞）などが挙げられ、BmNPVの宿主（感染、継代細胞）としてはBmN4細胞などが挙げられる。Sf細胞は、BmN4細胞などに比べ増殖速度が速いこと、また、AcNPVはヒト肝細胞およびヒト胎児腎細胞などにも感染する能力を有することから、AcNPV系のベクターが好ましい。

宿主としては、*Spodoptera frugiperda* 細胞系統 Sf9 および Sf21 などが *S. frugiperda* 幼虫の卵巣組織から確立しており、Invitrogen社あるいはPharmingen社（San Diego, CA）、又はATCCなどから入手可能である。さらに、生きている昆虫幼虫を宿主細胞系として使用することもできる。

本発明で用いる組換えウイルスを構築する方法は、常法に従って行えばよく、例えば次の手順で行うことができる。

まず、発現させたい蛋白質の遺伝子をトランスファーベクターに挿入して組換えトランスファーベクターを構築する。

トランスファーベクターの全体の大きさは一般的には数kb～10kb程度であり、そのうちの約3kbはプラスミド由来の骨格であり、アンピシリン等の抗

生物質耐性遺伝子と細菌のDNA複製開始のシグナルを含んでいる。通常のトランスファーベクターではこの骨格以外に、多角体遺伝子の5'領域と3'領域をそれぞれ数kbずつ含み、以下に述べるようなトランスフェクションを行った際に、この配列間で目的遺伝子と多角体遺伝子との間で相同組換えが引き起こる。また、トランスファーベクターには蛋白質遺伝子を発現させるためのプラモーターを含むことが好ましい。プロモーターとしては、多角体遺伝子のプロモーター、p10遺伝子のプロモーター、キャプシド遺伝子のプロモーターなどが挙げられる。

トランスファーベクターの種類は特に限定されない。トランスファーベクターの具体例としては、AcNPV系トランスファーベクターとしては、pEVmXIV2、pAcSG1、pVL1392/1393、pAcMP2/3、pAcJP1、pAcUW21、pAcDZ1、pBlueBacIII、pAcUW51、pAcAB3、pAc360、pBlueBacHis、pVT-Bac33、pAcUW1、pAcUW42/43などが挙げられ、BmNPV系トランスファーベクターとしては、pBK283、pBK5、pBB30、pBE1、pBE2、pBK3、pBK52、pBKblue、pBKblue2、pBFシリーズ（以上、フナコシ株式会社、藤沢薬品工業株式会社等から入手可能）などが挙げられる。

次に、組換えウイルスを作製するために、上記の組換えトランスファーベクターをウイルスと混合した後、宿主として用いる培養細胞に移入するか、あるいは予めウイルスで感染させた宿主として用いる培養細胞に上記のトランスファーベクターを移入し、組換えトランスファーベクターとウイルスゲノムDNAとの間に相同組み換えを起こさせ、組み換えウイルスを構築する。

ここで宿主として用いる培養細胞とは、上記した宿主が挙げられ、通常、昆虫培養細胞（Sf9細胞やBmN細胞など）である。培養条件は、当業者により適宜決定されるが、具体的にはSf9細胞を用いた場合は10%ウシ胎児血清を含む培地で、28℃前後で培養することが好ましい。このようにして構築された組み換えウイルスは、常法、例えばプラークアッセイなどによって精製することができる。なお、このようにして作製された組換えウイルスは、核多角体病ウイル

スの多角体蛋白質の遺伝子領域に外来のDNAが置換または挿入されており多角体を形成することができないため、非組換えウイルスと容易に区別することが可能である。

本発明の方法では、前記の組換えバキュロウイルスを、上記した適当な宿主（*Spodoptera Frugiperda* 細胞系統 Sf9 および Sf21 などの培養細胞、又は昆虫幼虫など）に感染させ、一定時間後（例えば、72 時間後等）に培養上清から細胞外発芽ウイルス（budded virus, BV）を遠心などの分離操作によって回収することにより、目的蛋白質を回収することができる。なお、組換えバキュロウイルスは1種類のみ感染させてもよいし、2種類以上の組換えバキュロウイルスを組み合わせ共感染させてもよい。

細胞外発芽バキュロウイルスの回収は、例えば、以下のように行うことができる。

まず感染細胞の培養液を 500～1,000 g で遠心分離して、細胞外発芽バキュロウイルスを含む上清を回収する。この上清を約 30,000～50,000 g で遠心分離して細胞外発芽バキュロウイルスを含む沈殿物を得る。この沈殿物を適当な緩衝液に懸濁し、再度、適当な濃度勾配（例えば、スクロースの連続勾配等）の上にウイルスの懸濁物を重ね、100,000g で遠心分離して分画する。得られた画分の中から所望の蛋白質を含む画分を選択すればよい。

さらに、発現させた蛋白質を可溶化した形態で得る場合には、感染細胞の培養液から例えば 40000 g で遠心分離することにより細胞外発芽ウイルスを回収する。この回収されたペレットを適当な緩衝液に懸濁し、lyso-phosphatidylcholin 等の溶解剤で処理し、さらに 30000 rpm で遠心分離を行うことにより上清と沈澱に分離する。可溶化された目的蛋白質は上清中に回収される。

上記した本発明の方法により回収される発現蛋白質は、その活性化形態として回収されることを特徴とする。本発明の方法により回収される蛋白質は、好ましくは少なくとも 50% 以上、より好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 70% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、特に好ましくは 95% 以上が活性化形態で回収される。このような活性化形態の膜蛋白質を

高い割合で回収することは従来法では不可能であった。

本発明はさらに、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも1種の組換えバキュロウィルスに感染させた宿主が放出する発芽バキュロウィルスを用いて、上記蛋白質とその他の化学物質との相互作用を測定することを含む化学物質のスクリーニング方法を提供する。

スクリーニングに供される化学物質としては、例えばペプチド、ポリペプチド、合成化合物、微生物発酵物、生物体（植物又は動物の組織、微生物、又は細胞などを含む）からの抽出物、あるいはそれらのライブラリーが挙げられる。ライブラリーとしては、合成化合物ライブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）、ペプチドライブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）などが挙げられる。スクリーニングに供される化学物質は、天然物でも合成物でもよく、また候補となる単一の化学物質を独立に試験しても、いくつかの候補となる化学物質の混合物（ライブラリーなどを含む）について試験をしてもよい。また、細胞抽出物のような混合物を分画したものについてスクリーニングを行い、分画を重ねて、所望の活性を有する物質を単離することも可能である。

これらの化学物質は、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質と相互作用することが予想される物質であり、さらに好ましくは、上記蛋白質に対する阻害薬または活性化薬物である。

本発明はさらに、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも1種の組換えバキュロウィルスを感染させた宿主が放出する発芽バキュロウィルスを免疫原として用いることを特徴とする、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、

膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質に対する抗体を作製する方法を提供する。

抗体の作成は定法により行うことができる。ポリクローナル抗体を作製する場合には、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも1種の組換えバキュロウイルスを感染させた宿主が放出する発芽バキュロウイルスを抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫感作することができる。免疫感作は、通常の免疫感作の方法に従い、例えば抗原を1回以上投与することにより行うことができる。

抗原投与は、例えば、7から30日、特に12から16日間隔で2または3回投与することが好ましく、投与量も適宜選択できる。抗原の投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹膜腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹膜腔内もしくは皮下に注射することにより投与することが好ましい。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバント、R A S [MPL(Monophosphoryl Lipid A)+TDM(Synthetic Trehalose Dicorynomycolate)+CWS(Cell Wall Skeleton) アジュバントシステム]、水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができるが、投与経路や条件等によっては、上記したアジュバントは使用しない場合もある。

免疫感作した哺乳動物を、例えば0.5から4ヶ月間飼育した後、該哺乳動物の血清を耳静脈等から少量サンプリングし、抗体価を測定する。抗体価が上昇してきたら、状況に応じて抗原の投与を適当回数実施する。例えば100 μ g~1000 μ gの抗原を用いて追加免疫を行なう。最後の投与から1~2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から通常の方法により血液を採取して、該血液を、例えば遠

心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の通常の方法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、所望のポリクローナル抗体を得ることができる。

また、モノクローナル抗体を作製する場合には、例えば、抗体産生細胞とミエローマ細胞株との細胞融合によりハイブリドーマを作製することにより所望のモノクローナル抗体を得ることができる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下のような細胞融合法によって得ることができる。

抗体産生細胞としては、免疫された動物からの脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等を使用する。抗原としては、細胞外発芽バキュロウイルスを使用する。免疫される動物としてはマウス、ラット等が使用され、これらの動物への抗原の投与は常法に従って行う。例えば完全フロインドアジュバント、不完全フロインドアジュバントなどのアジュバントと抗原である発芽バキュロウイルスとの懸濁液もしくは乳化液を調製し、これを動物の静脈、皮下、皮内、腹腔内等に数回投与することによって動物を免疫化する。免疫化した動物から抗体産生細胞として例えば脾細胞を取得し、これとミエローマ細胞とをそれ自体公知の方法 (G.Kohler et al., Nature, 256 495 (1975)) により融合することにより、ハイブリドーマを作製することができる。細胞融合に使用するミエローマ細胞株としては、例えばマウスでは P 3 X 6 3 A g 8、P 3 U 1 株、S p 2 / 0 株などが挙げられる。細胞融合を行なうに際しては、ポリエチレングリコール、センダイウイルスなどの融合促進剤を用い、細胞融合後のハイブリドーマの選抜にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (H A T) 培地を常法に従って使用することができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは限界希釈法等によりクローニングを行い、さらにスクリーニングを行なうことにより、所望の蛋白質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する細胞株を得ることができる。

このようにして得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清も

しくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができる。例えば、硫酸分画、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせ使用できる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

実施例

実施例 1 : ステロール調節蛋白質 (SREBP 2) の精製と抗血清の作成

SREBP 2 は LDL 受容体や HMG-CoA 還元酵素など細胞内コレステロール調節に関わるキーエンザイムの転写調節をつかさどる転写因子である (Brown MS, Goldstein J., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 1999 Sep 28;96(20):11041-8, A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood)。

125 kd の前駆体蛋白質が 2 回膜貫通型蛋白質として ER 膜に存在する。細胞内コレステロールが欠乏すると、プロテアーゼによる 2 段階の切断により、膜貫通部位を切りはなされた SREBP 2 が細胞質に解き放たれ、核へと移行し、コレステロール調節遺伝子のプロモーター上の sre 配列に結合することにより、転写を活性化する (Brown MS, Goldstein J., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1999 Sep 28;96(20):11041-8, A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood)。

(1) 組換えバキュロウイルスの作成と Sf 9 細胞培養

ヒト SREBP 2 全長遺伝子 (Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X., Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1993 Dec 15;90(24):11603-7., SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element) を pBlueBacTM ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に組み込んだ。Sf 9 細胞 (Invitrogen) は 10% ウシ胎児血清 (Sigma)、ペニシリン (100 units/ml) 及びストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含む Grace's supplemented media (GIBCO BRL) で 27°C で 10 cm 径ディッシュに継代培養し

た。大量培養は1 Lのスピナーフラスコ (Wheaton) で 0.001%の pluronic F-68(GIBCO BRL)を添加して行った。組換えバキュロウイルスの作成は説明書 (Bac-N-Blue™ Transfection Kit, Invitrogen) に従い、Sf 9 細胞に Bac-N-Blue DNA (ApMNPV 由来) と 4 μ g の pBlueBac-SREBP2 とを共感染させ組換えウイルスを作成した。

(2) 発現の SDS-PAGE とウェスタンブロット解析

(1) で作製した組換えウイルスを 6 well ディッシュにて 0.83×10^6 個/well の Sf 9 細胞に MOI (multiplicity of infection) 5 で感染させ、経時的 (24、48 時間、72 時間) に細胞と培養上清を集めた。一定時間培養後、Sf 9 細胞をセルスクレイパーをもちいて剥離し、800g で 10 分間の遠沈による沈澱を細胞画分とし、上清を培養上清画分としサンプル調整までマイナス 70°C に保存した。細胞画分は 1 well あたり 100 μ l の等張リン酸バッファー (0.1% Triton X-100, aprotinin 0.5 μ g/ml, leupeptin 0.5 μ g/ml, pepstatin A 1 μ g/ml を含むリン酸緩衝生理食塩水) に懸濁し、PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) を 100 μ g/ml 加え、4°C 30 分間ボルテックスしたのち、1000g で 10 分間の遠沈の上清 80 μ l に 20 μ l の 5 \times SDS サンプルバッファー (0.24 M の Tris-HCl, pH6.8, 2.25% の β -メルカプトエタノール, 2.25% の SDS, 50% のグリセロール, 0.0015% のブロモフェノールブルー) を加え、95°C 10 分間熱処理した。培養上清画分はそのまま 80 μ l に 20 μ l の 5 \times SDS サンプルバッファーを加え熱処理を行った。

これらのサンプルを 8% SDS-PAGE でゲル電気泳動したのち、50 V で 2 時間ニトロセルロース膜 (Highbond ECL, Amersham) に転写した。転写膜はブロックエースで 30 分間ブロックした後、SREBP 2 のカルボキシル末端を認識するモノクローナル抗体 1C6 (ATCC No CRL-2224) のマウス腹水標品 3000 倍を室温で 1 時間反応させ、TBS (20 mM の Tris-buffered saline, pH7.4) で 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗マウス IgG 抗体 (Sigma) で 1 時間反応させ、TBS で洗浄後、Supersignal west dura (Pierce) で化学発光させ、X 線フィルムに感光させた。

(3) Sf9 大量浮遊培養と発芽ウイルスのスクロース密度勾配遠心

Sf9 細胞を 1 L のスピナーフラスコ (Wheaton) に 5×10^8 個 / 500 ml の濃度で Grace's supplemented medium に 10 % FCS、0.001 % PluronicF-68 (Gibco) を添加し、MOI 5 で SREBP 2 組換えウイルスを感染させ 72 時間培養した。800 g、10 分間の遠心により細胞を取り除き、上清を 40000 g、20 分間超遠心して、その沈澱を 4 ml の TE バッファー (10 mM の Tris, 1 mM の EDTA, pH 7.4) にサスペンドした。ベックマン超遠心器 SW 28 ローターのチューブに 25 % ~ 56 % の連続スクロース勾配 36 ml を TE バッファーで作成し、上記ウイルスの suspension 1.2 ml を上に重ね、100,000 g で 90 分間遠心後、遠心チューブ上端より 1.5 ml ずつ分画採取した。

(4) SREBP 2 の可溶化

Sf9 (1×10^9) 500 ml 浮遊培養液に SREBP 2 組換えウイルスを MOI 5 で感染させ、72 時間後、細胞外発芽ウイルス (budded virus, BV) を 40000 g で 20 分間の超遠心で回収した。超遠心のペレットを TBS 4 ml に懸濁し、濃度 1 % になるように lyso-phosphatidylcholin (Sigma) を加え、室温で 2 時間処理した。ベックマンローター 90Ti で 30000 rpm で 20 分間の遠心分離を行い、上清と沈澱を分離回収した。可溶化された蛋白質は上清に回収される。

(5) アフィニティークロマトグラフィー

1C6 を分泌するハイブリドーマ細胞 (ATCC) の培養上清 4 L からプロテイン G カラム (Pharmacia) を用いて 40 mg の IgG を精製し、CNBr activated-sepharose (Pharmacia) 8 ml にカップリングして 1C6 アフィニティークロマトグラフィーを作成した。

上清画分に回収された可溶化蛋白を PD 10 カラム (Pharmacia) を用いてバッファー A (20 mM の Octyl-glucose を含む 20 mM の HEPES バッファー、pH 7.4) にバッファー交換し、その後上記 1C6 アフィニティークロマトグラフィー 2 ml にアプライし、0.5 M の NaCl を含むバッファー A で洗浄した後、10 M の尿素を含むバッファー A で溶出した。容出画分を再度 PD 10 カラムでバッファー A に

バッファー交換したのち、MonoS カラム (Pharmacia) にアプライし、ファルマシア SMART システムにて、0~0.5M の NaCl 直線グラジエント溶出を行った。

(6) SREBP 2 の発現

発現量をカルボキシ末端を認識するモノクローナル抗体 1C6 (ATCC, USA) を用いてウエスタンブロット法により確認した (図1)。その結果、Sf9 細胞には24 時間後からに発現が確認され、48 時間後には培養上清に発現が認められた。この48 時間後に培養上清に回収される SREBP 2 の由来を確認するため、培養上清を遠心分離したところ、800g での30 分間の遠心では上清に回収され、4000g で20 分間の遠心ではペレット画分に回収された (図2)。これは培養上清に存在する SREBP 2 が死細胞などの debris ではなく、膜あるいは細胞外ウイルスに由来するものであることを示唆する。さらにこのペレット画分をスクロース密度勾配遠心にて分画したところ、SREBP 2 タンパク質は SDS-PAGE 上クマシー染色で確認されるウイルスエンベロープタンパク質 gp64 と同じ画分に回収された (図3)。これは、SREBP 2 が細胞膜の破片ではなくウイルスに発現されていることを示す結果である。

さらにこの画分を1% リゾレシチンで処理すると、80% 程度が可溶画分に回収され、1C6 抗体を CNBr セファロースにカップリングした 1C6 アフィニティーカラムによって精製可能である (図4)。

(7) マウスへの免疫

1×10^9 細胞 / 500ml の Sf9 浮遊細胞に 5MOI の SREBP 2 組換えウイルスを感染させ、72 時間後超遠心分離により、発芽バキュロウイルス (BV) をリン酸緩衝液 (PBS) 4ml に懸濁回収した。マウスを二匹ずつ3つのグループにわけ、それぞれに0.1 μ l、1 μ l、10 μ l 相当のウイルス溶液を免疫して、二回の免疫により抗血清が作成されることを確認した (図5)。

実施例2 : S1P の発現

S1P はステロール調節エレメント結合タンパク質 SREBP の前駆体を切断する一

回膜貫通型のプロテアーゼである (Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS., Mol Cell. 1998 Oct;2(4):505-14., Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells)。SREBP の ER 腔内ループ中にある RSVL 配列を認識し、ロイシン残基のカルボキシル端で切断する。1052 アミノ酸よりなるプロ体 (148 kd) として ER に合成された後に、シグナルペプチドが切断され A 型 S1P (120 kd) となる。その後ゴルジ体に輸送され自己分解で活性化し、B 型 (106 kd) もしくは C 型 S1P (98 kd) となる (Espenshade PJ, Cheng D, Goldstein JL, Brown MS., J Biol Chem. 1999 Aug 6;274(32):22795-804., Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins)。神経栄養因子 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) のプロセッシング酵素としても報告されている (Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, Mamarbachi AM, Benjannet S, Toure BB, Basak A, Munzer JS, Marcinkiewicz J, Zhong M, Barale JC, Lazure C, Murphy RA, Chretien M, Marcinkiewicz M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999 Feb 16;96(4):1321-6. Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization)。

実施例 1 と同様に、ヒト S1P cDNA (KIAA0091, Kazusa DNA Research Institute) を pBlueBachis2™ に組み込んだベクターを作成し、ApMNPV DNA (BAC-N-BLUE™, Invitrogen) と共に Sf9 細胞に共感染させ、組換えウイルスを得た。High Five™ 細胞 (Invitrogen) は 16.5mM の L-glutamine を添加した Express Five SFM (Gibco) 培地に浮遊継代培養した。

この組換えウイルスを High Five™ 細胞(Invitrogen)に MOI 5 にて感染させ、実施例 1 と同様に細胞外発芽ウイルス (BV) を調製した。 ヒト S1P の部分アミノ酸配列 589-604 を合成し、Keyhole Limpet Hemocyanin にコンジュゲートしてウサギに免疫し抗血清 R03 を得た。

調製した BV をもちいて、S1P の BV への発現を R03 のイムノブロットにて調べたところ実施例 1 と同様 48 時間以降の培養上清遠沈画分 (BV 画分) に回収さ

れた (図 6)。

実施例 3 : 膜プロテアーゼの活性測定

実施例 2 で前記した通り、S1P は SREBP の 125 kd の前駆体蛋白質をそのほぼ真ん中で切断する酵素である。切断サイトは RXXL という配列を含み、その L (ロイシン) のカルボキシ端で切断が起こる。SREBP 2 の場合 2 つの膜貫通部位の間、小胞体腔に突き出したループのほぼ真ん中に RSVL という S1P の切断サイトが存在し、細胞内コレステロールが減少した場合ゴルジ腔内でこの切断が起こると考えられている (Brown MS, Goldstein JL., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999 Sept.;96:11041-11240., A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood)。

実施例 1 により細胞外ウイルス (BV) エンベロープに SREBP 2 が発現された際に正しいオリエンテーションで発現されていれば、この SREBP 2 の切断部位はウイルスの外側に向いていることになる。同様に実施例 2 により BV に発現された S1P のオリエンテーションが正しければ、その活性部位はウイルスの外側にあることになる。そこで、この両者のウイルス溶液を混合しインキュベーションして、S1P による SREBP 2 の切断が起こるかどうかを確かめた。

(方法及び結果)

S1P の SREBP2 切断活性の測定法

S1P または SREBP のリコンビナトウイルスを Sf9 細胞に MOI 5 で感染させ、72 時間後に BV 画分を実施例 1 および実施例 2 と同様に遠沈により回収し、TBS バッファー (10mM Tris, 150mM NaCl, pH7.5) で懸濁した。TBS に懸濁した BV はタンパク定量キット (Bio-Rad) でタンパク定量を行なった。基質となる SREBP 2-BV と酵素の S1P-BV は 1 反応液中の最終濃度がそれぞれ 10 μ g となるようにした。また、S1P の活性化に必要なカルシウムイオンはカルシウムアセテートを測定濃度になるように反応液に添加した。反応は BV 溶液にカルシウムおよび EDTA (pH7.4)、EGTA (pH7.4) を添加し、1 反応体積が 20 μ l になるよう TBS バッファー (pH7.4) でメスアップした後、37°C で 12 時間インキュベーションした。反応後の溶液は、

5×SDS サンプルバッファーで 95°C、10 分の熱処理をし、8%の SDS-PAGE 後、SREBP 2 のアミノ末端に対するウサギ抗血清 R004 を用いたウェスタンブロットを行なった。

S1P の SREBP2 切断活性の測定

SREBP、または S1P を発現させた BV を混和して 37°C で 12 時間インキュベートしたところ、5 mM カルシウム存在下で反応させた場合、抗血清 R004 によるウェスタンブロットで SREBP の分解産物と考えられる二本のメジャーなバンドが検出された (図7)。この分解産物と考えられるバンドはタンパク移動度 (Rf 値) から計算したところ、分子量約 78 kDa と 64 kDa であった。このうち 64 kDa は、報告されている SREBP-2 の S1P 切断による分解産物 (N 端) の分子量と一致した。また、この分解は 10 mM の EDTA により完全に阻害された。これらの結果は報告されている S1P の性質と一致する (Toure, B. B., Munzer, J. S., Basak, A., Benjannet, S., Rochemont, J., Lazure, C., Chretien, M. and Seidah, N. G. (2000): Biosynthesis and Enzymatic Characterization of Human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment. *J. Biol. Chem.* 275, 2349-2358)。しかし、78kDa の分解産物の報告はなく、新たな切断点が存在するのがあるいは in vitro でのみ観察される分解なのかはさらに精製して解析する必要がある。

実施例 4 : SCAP の発現、並びに SREBP 2 と SCAP との共発現

SCAP (SREBP cleavage activating protein) はステロールセンサードメイン (SSD) を持つ 8 回膜貫通型の膜蛋白質で、ER 膜に SREBP とヘテロ二量体を形成して存在する (Loisel TP, Ansanay H, St-Onge S, Gay B, Boulanger P, Strosberg AD, Marullo S, Bouvier M., *Nat. Biotechnol.* 1997 Nov;15(12):1300-4., Recovery of homogeneous and functional beta 2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles)。SSD がコレステロールの減少を感知し、未知の機構により、SREBP を S1P の分布するゴルジ体へとエスコートする (DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL, Espenshade PJ., *Cell.* 1999 Dec 23;99(7):703-12., Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of

site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi)。このように SCAP はコレステロール依存性に SREBP を輸送あるいは切断酵素の活性化をおこなう活性化因子として知られている。

SCAP の発現

ヒト SCAPcDNA (KIAA 0199, Kazusa DNA Research Institute)を pBlueBachis2™ (Invitrogen)に組み込んだベクターを作成し、ApMNPV DNA (BAC-N-BLUE™, Invitrogen)と共に Sf9 細胞に共感染させ、組換えウイルスを得た。これを 実施例 1 と同様に Sf9 細胞に MOI 5 にて感染させ、His-tag に対する抗体 (Qiagen) でイムノブロットした結果、Sf9 細胞に発現されている SCAP は凝集しているのに比べ、BV に発現している SCAP は正しい泳動度を示した (図 8)。

SREBP 2 と SCAP の共発現

SREBP 2 と SCAP はカルボキシル末端で相互作用し、ヘテロ 2 量体を形成し、この複合体がコレステロール調節に重要であると考えられている (Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL., J.Biol.Chem. 1997 Aug 8;272(32):20213-21., Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein)。

実施例 1 で作成した SREBP 2 の組換えウイルスと SCAP の組換えウイルスを Sf9 細胞にそれぞれ MOI 5 で共感染させ、72 時間後 200mL の培養上清から回収した BV を 4mL の TBS に懸濁した。そのうち 1 mL を実施例 1 の SREBP 2 の可溶化と同様に濃度 1% の lyso-phosphatidylcholin (Sigma)を加えて室温で 2 時間処理した。その後、4°C で 10,000 g, 10 分間の遠心分離を行い、上清と沈澱を分離回収し、上清を可溶画分、沈澱を可溶化後ペレットとした。可溶画分を 500 μ l ずつ 2 つの 1.5ml チューブに分注し、1C6 アフィニティーセファロース 30 μ l または Ni-NTA アガロース (Qiagen) 30 μ l を添加して、4°C で 16 時間、回転混和した。それぞれのチューブを 300 g、3 分間遠心分離し、上清を免沈上清とし、沈澱を免沈ペレットとした。免沈上清 200 μ l をアセトン沈澱 (5 倍量のアセトン添加、

? 20°Cに 30 分間置いた後、3000g、20 分間遠沈) し、80 μ l の溶解バッファー (10 mM の Tris-HCl, pH6.8, 100 mM の NaCl, 1% の SDS, 1 mM の sodium EDTA, 1 mM の sodium EGTA) に懸濁し、20 μ l の 5 \times SDS サンプルバッファーを加えて 95°C 5 分熱処理して SDS-PAGE 用サンプル(図 9 レーン 4、5)とした。

免沈ペレットは 500 μ l の 0.5% lyso-phosphatidylcholin を含む TBS に懸濁し、4°C で 16 時間、回転混和し、これを一回目の洗いとした。二回目、三回目の洗いは同量のバッファーを加え 1 時間回転混和し、300 g、3 分の遠心分離により上清を除いた。洗浄後、免沈ペレットを 100 μ l の 2 \times SDS サンプルバッファー (60 mM の Tris-HCl, pH6.8, 10% の β -mercaptoethanol, 6% の SDS, 10% の glycerol, 0.008% の bromophenolblue) に懸濁した。95°C、10 分間の熱処理をした後、1000 g で 10 分間の遠心分離をおこない、上清を SDS-PAGE 用サンプル(図 9 レーン 6、7)として回収した。

SDS-ゲル電気泳動、イムノブロット染色は実施例 1 と同様に行った。それぞれの SDS-PAGE 用サンプルは 7.5% SDS-PAGE でゲル電気泳動したのち、70 V で 2 時間ニトロセルロース膜に転写してウェスタンブロットを行った。1C6 抗体または His-tag に対する抗体により SREBP と SCAP の検出を行った。Ni-NTA Agarose により、SREBP と SCAP が共沈することが見られ、バキュロ発現系でも複合体を形成していると考えられた(図 9)。1C6 アフィニティーセファロースでは複合体形成をしていない SREBP のみ沈降するが、これは SCAP との複合体形成により 1C6 が抗原部位を認識できなくなったためと考えられる。

産業上の利用の可能性

sf 9 細胞核より回収される膜蛋白質は分解産物が多いのに比べ、本発明による、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質を発芽バキュロウイルス中に発現させる方法によれば、ウイルスエンベロープに回収される小胞体膜蛋白質は単一バンドで回収され、安定性が高い。膜蛋白質(特に、小胞体膜蛋白質)は細胞から分離する際にライソゾームなどの分解酵素にさらさ

れるために調製が一般に困難であるが、本発明の方法により細胞外ウイルスエンベロープに発現させた膜蛋白質は調製が容易で安定性に優れている。本発明の方法は、特異抗体の作成、膜タンパクの精製、膜蛋白質相互作用などの測定に利用することが可能である。

"P00000" P00000